

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-132189

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)6月19日

C 12 N 15/00
C 07 H 21/02
// C 12 P 21/02

7115-4B
6742-4C
7235-4B

審査請求 有 発明の数 2 (全7頁)

⑮ 発明の名称 ダイズ貯蔵タンパク質のメッセンジャーRNAおよびその調製法

⑯ 特 願 昭59-254217

⑰ 出 願 昭59(1984)12月3日

⑱ 発 明 者 深 澤 親 房 茨城県新治郡桜村吾妻2丁目802-203

⑲ 出 願 人 農林水産省食品総合研
究所長

⑳ 代 理 人 弁理士 久保田 藤郎

明 細 書

1. 発明の名称

ダイズ貯蔵タンパク質のメッセンジャーRNA
およびその調製法

2. 特許請求の範囲

(1) ダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ダイズ種子より得られ、ショ糖密度勾配遠心法による分画により18Sよりやや重い画分に得られるメッセンジャーRNA。

(2) ダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ショ糖密度勾配遠心法により18Sよりやや重い画分に得られるメッセンジャーRNAをダイズ種子より抽出し分画することを特徴とするメッセンジャーRNAの調製法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ダイズ種子より得られ、ショ糖密度勾配遠心法により18Sよりやや重い画分に得られるメッセンジャーRNA(以下mRNAと略す。)およびその調製法に関する。

ダイズ種子に蓄えられる物質の主なものとしてタンパク質、脂質およびフィチン酸塩などが知られているが、これらの貯蔵物質が種子の発熟過程でどのように合成され、蓄積されるのかを知ることとは種子生理学的見地からはもとより食品化学の面からも重要である。

本発明者はダイズ貯蔵タンパク質の生理学的役割、生産方法等について研究を重ねてきたが、その過程においてダイズ種子からダイズ貯蔵タンパク質に対応するmRNAを抽出することに成功し、このmRNAからこれに対応する相補的DNA(以下cDNAと略す。)を調製することに成功した。このようにして得たDNAを微生物細胞内あるいは植物細胞内で発現させることにより目的とするダイズ貯蔵タンパク質を製造することができ。

本発明はダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ダイズ種子より得られ、ショ糖密度勾配遠心法による分画により18Sよりやや重い画分に得られるmRNAおよびその製造法を提供するものである。

本発明のmRNAは、上記したようにダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ショ糖密度勾配遠心法やゲル濾過法による分画ならびにアガロース電気泳動法により18Sよりやや重い画分として得られるものであり、このmRNAはダイズ種子より抽出分離することによって製造できる。

本発明に用いるmRNAの材料としては種々の過程、たとえば登熟期にあるダイズ種子を使用できる。

ダイズ種子よりダイズ貯蔵タンパク質に対応するmRNAを抽出するには種子の種類を問わず常法によって行なえばよい。たとえば組織を2~5容のNP-40, SDS, Triton X-100などの界面活性剤とフェノール溶液を混合してホモゲナイザーや凍結融解などの物理的方法を用いて細胞を破碎、可溶化し、遠心した後の上清に冷エタノールを加えてRNAを沈殿させる。

また、必要に応じてダイズ貯蔵タンパク質に対応する抗体を用いてダイズ貯蔵タンパク質合成途上のポリゾームを沈降せしめ、これによりmRNA

を界面活性剤などで抽出する方法を行なうことができる。

また、本発明のmRNAの精製については、オリゴdT-セルロース、ポリウーセファロースなどの吸着カラムによる精製法、等速(isokinetic)なショ糖密度包配遠心法による分画等によって行なうことができる。このような精製操作により本発明のmRNAは18Sよりやや重い画分として得られる。

上記の如くして得られたmRNAが目的とするダイズ貯蔵タンパク質に対応するものであることを確認するためには、mRNAをタンパク質に翻訳させ、その抗体等を用いてそのタンパク質を同定する等の方法を行なえばよい。たとえばmRNAをタンパク質に翻訳するのによく用いられる系であるReticulocyte-lysate(網状赤血球ライゼート)、Wheat germ(コムギ胚芽)などの無細胞系でタンパク質に翻訳させることが行なわれる。

かくして得られたダイズ貯蔵タンパク質mRNAの最大の利用法は、これらのmRNAよりインビ

トロでcDNAを合成し、適当なベクターなどに組み込んで微生物あるいは植物等でダイズ貯蔵タンパク質を生産することを可能ならしめることにある。

このようなcDNAの合成は通常、試験管内で次のような方法で行なうことができる。mRNAを鋳型としてオリゴdTをプライマーとしてdATP, dGTP, dCTP, dTTPの存在下で逆転写酵素によりmRNAと相補的な単鎖cDNAを合成し、アルカリ処理で鋳型mRNAを分解・除去した後、オリゴdCを付加し、次いでオリゴdGをプライマーとして単鎖cDNAを鋳型にして逆転写酵素あるいはDNAポリメラーゼを用いて二重鎖cDNAを合成する。このようにして得られたDNA両端を必要によりエキソヌクレアーゼで処理し、それぞれに適当なDNAを接続しあるいはアニーリング可能な組合わせの塩基を複数個重合せしめる。しかる後、これを微生物ベクターに組み込む。組み込む方法はベクターを適当な制限酵素で切断し、必要により適当なり

ンカーまたはアニーリング可能な組合わせの塩基を複数個重合せしめる。このように加工した二重鎖DNAとベクターDNAを混合し、リガーゼを用いて接続せしめる。

得られた組み換えDNAはベクターの宿主微生物に導入する。宿主微生物としてはエシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属の微生物、バチルス・ズブチリス等のバチルス属の微生物、サッカロミセス・セレビシエ等のサッカロミセス属の微生物などが好適である。これらの微生物に使用されるベクターを以下に例示する。(蛋白質核酸酵素26巻4号(1981)参照)EK系プラスミドベクター(ストリンジエンド型)のpSC101, pRK353, pRK646, pRK248, pDF41等、EK系プラスミドベクター(リラックスド型)のCalB1, pVH51, pAC105, RaF2124, pCR1, pMB9, BR313, pBR322, pBR324, pBR325, pBR327, pBR328, pKY2289, pKY2700, pKN80, pKC7, pKB158, pMK2004, pACYC1, pACYC184,

λ du1 等, λ gt系ファージベクターの λ gt \cdot λ c \cdot λ gt \cdot λ B, λ WES \cdot λ B', λ Z Jvir \cdot λ B', λ ALO \cdot λ B, λ WES \cdot Ts622, λ Dam等, シャロンベクターのシャロン4A, シャロン3A, シャロン16A, シャロン13A, シャロン14A, シャロン15A, シャロン8, シャロン10, シャロン17, シャロン20等, チオライス (Tlollais) グループベクターのL512, λ ZEQS, λ ZYV5 ϕ , λ ZUV ϕ 2, λ ZUV ϕ 3, λ YEQS ϕ 1, λ YEQS ϕ , λ YEQS ϕ 3, λ Bam, λ Sst等, 枯草菌のプラスミドベクターpTA1015, pLS15, pTA1020, pLS28, pLS13, pTA1050, pTA1060, pTA1030, pTA1031等, スタフィロコッカス由来のプラスミドベクターpT127, pC194, pC221, pC223, pUB112, pUB110, pSA0501, pSA2100, pE194, pTP4, pTP5等, 酵母ベクターpJDB219, YEp13, YRp7, YIp1, pYC, pTC2.

微生物のベクター、たとえばpBR322などのPst IあるいはEcoRI siteなど目的に応じた個

所に組み込み、適当な宿主にトランスホームしてそのダイズ貯蔵タンパク質を宿主中で発現させることができる。

得られたmRNAがダイズ貯蔵タンパク質に対応する遺伝情報を有していることを以下の方法により確認する。

Reticulocyte lysate あるいは Wheat germ の系を用いPositive hybrid selection and invitro translation 法によりダイズ貯蔵タンパク質であることを同定する。

また、植物においてT-DNA ⁽⁵⁾ter領域を含むpAL1050ベクターを用いて遺伝子を植物に導入する。

組み換えDNAを挿入する場合 terのリーダー配列にin-frameに接続し、終止コドン領域もterのものを利用する。

上述のようにダイズ種子より本発明のmRNAを調製する方法を以下の実施例により詳しく説明する。なお、本実施例に示す以下のダイズ種子より得られる貯蔵タンパク質に対応するmRNAの

場合にも本発明は全く同様に実施できるものであり、本発明の範囲に含まれる。

実施例1

(1) 完熟ダイズからグリシニン(ダイズ主要貯蔵タンパク質の1つ)を精製し、酸性(以下、Aと略称する。)サブユニットを分離、精製する。このAサブユニットは分子量約35~40Kで、互いに免疫化学的に強い交叉性を示す。そこで、個々のAサブユニットに特異的な抗血清を調製する。抗血清の調製法としては、たとえば特定サブユニットでウサギに十分免疫(hyperimmunization)して得た抗血清に、他の酸性サブユニットタンパクの凍結乾燥粉末を加えて吸収操作を繰り返す方法が適用できる。特異性の検定は、オクテルローニのゲル内二重拡散法とウエスタンブロット法によった。

(2) 登熟中期(開花後38日目)のダイズ子葉から膜結合型ポリソームを調製し、SDS-フェノール法とポリU-セファロースカラム法でmRNAを精製する。一方、同じ時期の子葉から同様にし

て全mRNAを調製する。この全mRNA標品の一部はショ糖密度勾配遠心法(ショ糖10%(w/w)~30%(w/w))により分画し、赤血球無細胞タンパク合成系における翻訳産物の免疫化学的解析でグリシニンmRNA濃縮画分を同定する。

(3) 上記(2)の全mRNAに対するcDNAライブラリーを以下に記述する方法に従って作製する。

1) ss-cDNAの合成と構型mRNAのアルカリ分解シリコナイズしたエッペンドルチューブ(1.5ml)に10 μ lのX10cDNA緩衝液(0.5 M トリス-塩酸, 1.4 M 塩化カリウム, 0.8 M 酢酸マグネシウム), 3 μ lのRNasin(生化学工業40u/ μ l), 5 μ lのdATP, 5 μ lのdGTP, 4 μ lのdCTPおよびdTTP, 24 μ lのオリゴ(dT)₁₂₋₁₈(P-L Biochemicals社製, 0.2 mg/ μ l), 8 μ lのアクチノマイシンD(0.4 μ g/ μ l), 1 μ lの0.1 M DTT, 6 μ lの(α -³²P)dATPおよび10 μ lのmRNA(1 μ g/ μ l, 65 $^{\circ}$ C, 10分間処理した

後、急冷したもの)をこの順番に加えて混合して1秒間遠心し、液を底に集める。

42℃で2分間保温⁵後、20μℓのAMV逆転写酵素を加えて軽く混合し、1秒間遠心してこの混液(100μℓ)を42℃で60分間保温する。

反応液に20μℓの5M塩化ナトリウム、16μℓの250mMEDTA、2μℓの20%SDSおよび62μℓの蒸留水を加えて反応を止める。

これにフェノール混液(10mMトリス-塩酸(pH8.3)-2mMEDTAで飽和したフェノール液)200μℓを加えて激しく振盪する。

遠心して水層をとり、残りのフェノール層に122μℓの蒸留水、48μℓの5M塩化ナトリウム溶液を加えて再抽出し、先の水層と合わせてエーテル処理をして混入したフェノールを除去した後、30μℓの酢酸カリウム(pH5.0)と600μℓの冷エタノールを加えてエタノール沈殿する(ドライアイス-エタノール中で30分間または-70℃で1時間)。

この操作により約3~5μgのcDNAが得ら

i)で調製乾燥したss-cDNA(シリコナイズしたエッペンドルフチューブに入っている)に25μℓの蒸留水を加えて溶解し、遠心して底に集めて65℃で10分間処理し、急冷する。再び1秒間遠心し、これに5μℓのX10dT緩衝液(1.4Mカコジル酸カリウム(pH7.6)、0.6Mトリス塩基(19.3gのカコジル酸(free acid)と7.2gのトリズマ・ベース(Sigma社製)を50μℓの再蒸留水に溶かし、水酸化カリウムの粉末を加えてpHを7.6に調整、滅菌する)、5μℓの塩化コバルト、5μℓのDTTおよび5μℓのdCTPを加え十分に混合し遠心する。

これに5μℓのdT(4u/μℓ)を加えて軽く混合し、15℃で10分間保温する。この反応混液に10μℓの5M塩化ナトリウム、4μℓの250mMEDTA、36μℓの蒸留水を加え70℃で5分間熱処理する。

フェノール抽出後エタノール沈殿、洗浄後乾燥する。

iii) ds-cDNAの作製

れる。このss-cDNAを減圧乾燥し、45μℓの蒸留水を加えて溶解する。

これに5μℓの5N水酸化ナトリウム溶液を加えて混合し、1秒間遠心して液をチューブの底に集めて25℃で一晩保温し、mRNAを分解する。

50μℓのHepes-KOH(pH7.4)緩衝液を加えた後、ウルトロゲルAcA44のカラム(ゲルベットの高さ28cm)にのせて約0.6mlずつ分画する。void volume 画分(この条件ではフラクシオン番号6~8、GMサーベイメーターでチェックまたは液体シンチレーションカウンターを用いてCerenkov法で測定)を集める。

この画分に1/10容量の3M酢酸カリウム、2倍量の冷エタノールを加えて-70℃で1時間放置後遠心沈殿させ、2回70%エタノールで沈殿物を洗い(沈殿物をはがさないように静かにエタノールを重ねし、10分間遠心しながらrinseする)、減圧乾燥する。

ii) ss-cDNAの3'-OH末端へのdCホモポリマーの付加

上記ii)で作製した3'末端にdCホモポリマーを付加したss-cDNA標品(シリコナイズしたエッペンドルフチューブ中で乾燥保存したもの)に26μℓの蒸留水を加えて十分に溶解し、68℃、5分間処理後急冷する。

1秒間遠心後、10μℓのX10cDNA緩衝液、1μℓのDTT、10μℓのdATP、dGTP、dCTPおよびdTTP、15μℓのオリゴ(dG)₁₂₋₁₈を加えて混合後遠心し、次いで13μℓの逆転写酵素(5.8u/μℓ)を加えて42℃で1時間保温する。

反応液に20μℓの5M塩化ナトリウム、8μℓの250mMEDTA、2μℓの20%SDSおよび70μℓの蒸留水を加えて反応を停止させる。

常法に従ってフェノール抽出、エタノール沈殿、洗浄および乾燥後、40μℓの蒸留水を加えて溶解し、62℃、5分間処理後急冷し、遠心する。

これにX10Klenow緩衝液(0.67MK-リン酸緩衝液(pH7.4)、67mM塩化マグネシウム、10mM DTT)を10μℓ、dATP、dGTP、

dCTPおよびdTTPの各10 μ lずつを加えて、よく混合した後、DNAポリメラーゼI (Klenow 酵素, 5u/ μ l)を10 μ l加えて37℃で1時間反応させる。

40 μ lの5M塩化ナトリウム, 16 μ lの250 mM EDTA, 4 μ lの20% SDSおよび140 μ lの蒸留水を加えて反応を止めた後、フェノール抽出、エタノール沈殿を常法に従って行なう。必要とあれば、この段階でゲル電気泳動または中性シロ糖密度勾配法により低分子のds-cDNAを除去することもできる。

ds-cDNAに100 μ lの蒸留水を加えて溶解し、ウルトロゲルAcA44のカラム(ゲルベッドの高さ28cm)にのせて約0.6mlずつ分画し、void volume画分を集める(溶出パターンは液体シンチレーションカウンターを用いたGorenkov法で測定する)。

この画分に1/10量の3M酢酸カリウム, 2倍量の冷エタノールを加えて-70℃で1時間放置後、生じたds-cDNAの沈殿を遠心乾燥により回

ゴ(dG), 3'-tailed)を加えて混合し、68℃, 5分間処理した後、43℃にした恒温水槽中に移し2時間保温する。

恒温槽のスイッチを切り、少なくとも2時間以上(一晩そのまましておいてもよい)放置して室温まで下げた後、チューブを4℃に保存する。

vi) 形質転換(トランスフォーメーション)

DagertとEhrlichの方法によりRR1を宿主として $8.2 \times 10^4 \sim 1.4 \times 10^7$ 個形質転換株/ μ g pBR322 DNAの転換効率を得た。

(4)(2)のグリシニン中間サブユニット mRNAの濃縮画分に対する 32 P標識cDNAを作製しプローブとする。

(5)上記(4)で作製したプローブを用いて(3)のcDNAライブラリーの中からグリシニンサブユニットクローンをコロニーハイブリダイゼーション法で選別する。1023個のクローンのうち22個が陽性であった。

6)上記(5)で得た22個のクローンの中から挿入部分の長さが1kb以上のクローン(16個)を選

収し、洗浄、減圧乾燥する。

iv) プラスミドへ挿入のためのds-cDNAの末端加工

上記iii)で調製したds-cDNAに37 μ lの蒸留水を加えて溶解し、5 μ lのX10TdT緩衝液, 5 μ lのdCTDを加えて十分混合した後、3 μ lのTdTを加えて37℃で5分間保温する。

反応後、10 μ lの5M塩化ナトリウム, 4 μ lの250 mM EDTAおよび36 μ lの蒸留水を加えて70℃で5分間処理した後、常法に従ってフェノール抽出、エタノール沈殿、洗浄および減圧乾燥を行なう。

v) PstI切断3'末端オリゴdG付加pBR322とのアニーリング

ds-cDNA溶液(450 μ l)に50 μ lのX10アニーリング緩衝液(0.1Mトリス-塩酸(pH7.5), 1M塩化ナトリウム, 10mMEDTA)を加えて十分混合し、その100 μ lをとりエペンドルフチューブ(1.5ml, シリコナイズしたもの)に入れる。これに1 μ lのpBR322(オリ

び"positive hybrid selection and invitro translation"法によりグリシニンcDNAクローンを同定した。このうちの1つは約2kbの挿入部分を持っていた。このクローンをプローブとしたノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果からグリシニンmRNAの長さは約2.2kbであり、作製されたcDNAは完全長に近い。

クローニングしたcDNAのうちの1つグリシニンA₃B₄サブユニットcDNAの構造は第1表の通りであった。

実施例2

実施例1と同様の方法で得られたもう一つのグリシニンA₃A₄B₃サブユニットcDNAの構造は第2表の構造であった。



[illegible]

第 2 表

(ダイズグリシニン A, A', B, c DNA の塩基配列)

[illegible]